

Riesgos de la producción artesanal de microorganismos

Fernando Hercos Valicente

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Jéssica Leticia Abreu Martins

Ana Clara Pimenta Pereira

Amanda Naye Guimarães Tavares

Frederick Mendes Aguiar

Brasil se destaca por ser un país de dimensiones continentales, un clima predominantemente tropical y grandes extensiones de áreas sembradas con cultivos de importancia agrícola. De vez en cuando surgen fronteras agrícolas, siendo la más reciente MATOPIBA que incluye los estados de Maranhão, Tocantins, Piauí y Bahía, con gran capacidad productiva. En la mayoría de estas áreas, se realizan tres plantaciones anuales, lo que cambia radicalmente el paisaje agrícola brasileño, donde los problemas fitosanitarios ocurren durante todo el año. En este “puente verde”, que se hace con tres siembras al año, puede observarse principalmente con los cultivos de maíz, soja, algodón, frijol, etc. En Mato Grosso, por ejemplo, se siembra soja temprana en septiembre, soja tardía, algodón convencional, maíz convencional y algodón de segunda cosecha. Hay varias plagas y enfermedades importantes en este escenario único de la agricultura brasileña. El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo, destaca por ser una plaga polífaga, que puede alimentarse de maíz, sorgo, soja, algodón, frijol, etc. El gusano falso medidor, *Chrysodeixis includes*, que hasta hace 10 años era una plaga secundaria de los cultivos de soja, es otra plaga importante en este escenario, ya que es un importante defoliador de la soja y el algodón.

Dentro de este contexto, los problemas fitosanitarios ocurren con mayor frecuencia e incluyen la presencia de plagas y enfermedades en diferentes cultivos. Ante los desafíos que, constantemente encontrados en el campo para aumentar la producción de granos, la productividad y disminuir los costos, se ha intensificado la búsqueda de alternativas al uso de

plaguicidas. Lo que se busca son agentes de control biológico con costo de producción reducido y alta eficiencia para permitir que la tecnología relacionada con los productos biológicos esté disponible en el mercado y sea distribuida a diferentes cultivos.

Entre los organismos utilizados como control biológico de plagas y enfermedades, algunos de los agentes más difundidos son los hongos del género *Trichoderma* y la bacteria *Bacillus thuringiensis*.

***Trichoderma* spp.**

Según Bettiol et al. (2012), *Trichoderma* es uno de los principales agentes de control biológico utilizados en la agricultura y presenta resultados significativos en el control de una amplia gama de enfermedades.

Para que el control en campo sea efectivo, es necesario garantizar la calidad de todos los pasos involucrados en el proceso de producción, con el fin de garantizar la viabilidad del organismo y vigor necesarios (Adekunle et al., 2001).

Para satisfacer la gran demanda de productos biológicos, se hace necesaria la producción a gran escala del agente de biocontrol para abastecer un mercado en expansión y garantizar la distribución y aplicación del producto. Los estudios de Singh et al. (2007) mostraron varios sustratos potenciales con alta viabilidad para la producción de este hongo, entre ellos sorgo, trigo y arroz en grano. La fácil obtención de estos sustratos y su bajo costo son factores que contribuyen con la viabilidad de la producción industrial de este agente.

Durante el proceso de producción, el hongo se establece sobre el sustrato e inicia el proceso de liberación de esporas, lo cual favorece su reproducción (Hölker et al., 2004), con un periodo de crecimiento del agente de aproximadamente siete días. Uno de los principales problemas involucrados en este proceso es la posibilidad de contaminación del material con otros géneros de hongos e incluso bacterias, lo que genera riesgos para la salud (Bettiol; Morandi, 2009).

Otras metodologías para la producción de hongos fueron presentadas en trabajos de Bettiol y Morandi (2009), quienes usaron un medio líquido para optimizar el espacio, asegurar mayor pureza en el material y reducir el porcentaje de contaminación y así favorecer la propagación del hongo.

Según Anvisa (2013), el término bioseguridad se define como “una condición de seguridad alcanzada mediante un conjunto de acciones destinadas a prevenir, controlar, reducir o eliminar los riesgos inherentes a las actividades que pueden comprometer la salud humana, animal y ambiental”. En este sentido, el control de calidad se convierte en un paso fundamental en el proceso de elaboración de productos a base de microorganismos para

garantizar que el producto final esté libre de contaminación o, por lo menos con un nivel muy bajo, sea seguro tanto para el manipulador como para el medio ambiente y además que mantenga su eficacia.

Las empresas suelen evaluar la calidad de los productos a base de *Trichoderma* según tres criterios, a saber: recuento de esporas (mínimo 1×10^8 esporas/g), germinación mínima de 85% y viabilidad mínima de $8,5 \times 10^7$ CFU/g. Para estas evaluaciones se utilizan diferentes metodologías según la formulación del producto (Bettiol; Morandi, 2009).

El recuento del número de esporas se realiza con la ayuda de una cámara de Neubauer bajo aumento del microscopio. Para ello es necesario preparar una suspensión de esporas de *Trichoderma* y el resultado de este conteo se expresa en número de esporas por peso o volumen de producto biológico formulado. La metodología para evaluar el porcentaje de esporas viables consiste en dispensar una alícuota de la suspensión de esporas de *Trichoderma* en áreas delimitadas de la placa de Petri con medio PDA (agar papa dextrosa), incubar a 25 ± 2 °C para la germinación de esporas y contar el número de esporas viables bajo el microscopio óptico (Bettiol et al., 2012). Para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) la metodología consiste en homogeneizar el producto a base de *Trichoderma* con una solución salina esterilizada mezclada con Tween 80. A partir de esta solución se realizan diluciones seriadas, las cuales se distribuyen en cajas Petri con medio PDA y Triton y se incuban a 25 ± 2 °C en oscuridad para el posterior conteo del número de colonias formadas por *Trichoderma*. El resultado se expresa en unidades formadoras de colonias (UFC/mL) (Bettiol et al., 2012).

Sin embargo, las cepas seleccionadas para la producción de insumos biológicos hechos a base de *Trichoderma* registrados ante el MAPA y los procesos de control de calidad de estos productos son realizados por las empresas en condiciones de laboratorio. En este caso, en un ambiente controlado, los riesgos de contaminación se minimizan y son realizados por profesionales cualificados con la formación técnica necesaria. Para la concesión del registro del producto biológico en el MAPA, las empresas deben cumplir con una extensa lista de prerrequisitos que garantizan la seguridad y eficacia de estos productos (Brasil, 2012).

Control de calidad

Los riesgos asociados con la producción de agentes de control biológico son muy grandes cuando no se cumplen los estándares y procedimientos de laboratorio.

La producción de *Trichoderma* y otros insumos biológicos a base de microorganismos no se limita al mercado a escala comercial. Ha habido un creciente interés por la “producción casera” de estos bioproductos con el fin de reducir costos con productos fitosanitarios a base de microorganismos, sistema denominado “*on farm*” (en la finca) (Valicente et al., 2018). Hoy en día, se entiende por producción “*on farm*” aquella que se realiza en una finca sin las

condiciones mínimas de asepsia. Cabe mencionar que existen productores que cuentan en sus fincas con modernos laboratorios que cumplen con los estándares de producción, los cuales no encajan en el proceso “*on farm*”. En la mayoría de los casos donde se hace una “producción casera”, no se utilizan materiales esterilizados o laboratorios que cumplan los requisitos mínimos para su correcto funcionamiento, de manera de evitar la contaminación del producto final, así como el uso de materiales registrados como fuente de inóculo, sin autorización previa, constituyendo un caso de piratería. El uso de subproductos agroindustriales se considera una alternativa viable y económica para la producción *in situ* de *T. asperellum* (Santos-Villalobos et al., 2012) y *Bacillus thuringiensis* (Valicente; Mourão 2008). En el caso de *Trichoderma*, las esporas del hongo son obtenidas fácilmente mediante la cría sobre sustratos como arroz, maíz u otros granos, lo que permite que el producto final se aplique directamente a los cultivos o al suelo (Woo et al., 2014). Según Woo et al. (2014), los productos a base de *Trichoderma* comercializados están compuestos de una sola especie (67%), siendo el resto una combinación de especies conocidas y/o desconocidas, aislados o una mezcla de *Trichoderma* con otros microorganismos beneficiosos como el hongo micorrízico (*Glomus*) y las bacterias (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, etc.). Si un producto comercial está hecho a base de varios microorganismos benéficos, este también corre el riesgo de contaminación por condiciones que favorecen la rápida multiplicación de microorganismos indeseables y que pueden representar un riesgo para la salud humana y animal, además de la baja calidad del producto.

Además, existe una gran variedad de especies del género *Trichoderma* identificadas en diferentes ecosistemas. En un solo aislamiento realizado en una muestra de suelo en el sur de Alemania fueron identificados más de 350 materiales genéticos diferentes de *Trichoderma* spp. (Meinke et al., 2010). Algunas especies son consideradas patógenos de humanos, como *T. longibrachiatum*, relacionada con infecciones pulmonares (Miguel et al., 2005) y *T. fungemia*, relacionada con infecciones bacterianas en pacientes hospitalizados (Lagrange-Xélot et al., 2008). Asimismo, algunas especies producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos para animales y plantas, como tricotecenos y péptidos cíclicos, clasificados como micotoxinas. Los tricotecenos perjudican el crecimiento de las plantas y los péptidos cíclicos provocan la muerte celular al atacar la membrana de las células bacterianas eucariotas. Los isocianuros, otro tipo de metabolito secundario, atacan a los microorganismos del rumen en carneros y ovejas (Sandle, 2014). Estas investigaciones muestran la importancia de trabajar con el aislado puro, sin contaminantes, para que en el proceso de producción a gran escala no se reproduzcan organismos indeseables que puedan causar daño a los mamíferos.

Todos estos factores refuerzan aún más la importancia de aplicar técnicas específicas para la elaboración de productos biológicos basados en el uso de microorganismos tales como: virus, hongos, bacterias, etc. Cada organismo tiene una necesidad diferente de alcanzar una

concentración máxima en la elaboración final del producto. La ineficacia e inconsistencia de los resultados del desempeño en campo dificultan la difusión y el uso frecuente de productos elaborados de manera inadecuada en las propiedades rurales. Estos factores refuerzan la necesidad de control de calidad con la selección de aislamientos adecuados para ser utilizados en el control biológico.

Sivila y Álvarez (2013) publicaron el manual denominado “Producción Artesanal de *Trichoderma*”, dirigido a pequeños productores de la agricultura familiar. Los autores aclaran qué es el control biológico de las enfermedades de las plantas, qué son los microorganismos antagonicos, cuáles son las características del hongo *Trichoderma* sp. y sus mecanismos de acción para el control biológico de enfermedades que conducen a la protección de determinados cultivos.

También según Sivila y Alvarez (2013), para la producción de *Trichoderma*, la metodología más simple a utilizar es la fermentación sólida y este proceso se divide en varios pasos. Estos pasos son básicos para cualquier producción de producto orgánico, incluso para *B. thuringiensis*:

1. Selección del sustrato.
2. Preparación y acondicionamiento del sustrato.
3. Esterilización del material.
4. Inoculación del hongo *Trichoderma*.
5. Incubación.
6. Puede ser utilizado en campo o seco y formulado.
7. Secado.
8. Empaquetado.
9. Almacenamiento.

Para asegurar el control de calidad de los productos biológicos hechos a base de *Trichoderma* de manera artesanal, Sivila y Alvarez (2013) sugieren cuatro pruebas: determinación del grado de antagonismo, determinación de producción de esporas, determinación de viabilidad de esporas y determinación de contaminantes (pureza).

Sin embargo, los agricultores en unidades de producción familiar generalmente no cuentan con una estructura física para realizar los trámites para la producción de *Trichoderma*. En la etapa III de producción, donde uno de los procesos es la esterilización del sustrato, se suele utilizar baño María, ya que los productores no cuentan con autoclave. En el paso IV, la campana de flujo laminar a menudo se reemplaza por solo una llama debajo de un banco limpio con jabón y lejía comercial. La selección del aislado y el proceso de control de calidad depende de los laboratorios de microbiología, no siendo posible realizar las pruebas en predios rurales (Sivila; Álvarez, 2013).

Todos estos aspectos pueden reducir la calidad del producto final, lo que puede poner en riesgo la salud de los propios agricultores y puede dispersar organismos indeseables en el medio ambiente, como lo observaron Valicente et al. (2018) en la evaluación de la calidad de bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* producidos en predios rurales bajo el sistema “on farm”. En los sistemas de producción, todos los materiales y reactivos en los medios de cultivo, sin excepción, deben ser esterilizados (autoclavados a 120 °C durante 20 a 30 minutos) e inoculados con una cepa limpia, libre de contaminantes. Sin embargo, la producción que se realiza en predios rurales, en su mayoría, no cuenta con las condiciones de infraestructura requeridas, seguridad e higiene (Valicente et al., 2018). Valicente et al. (2018) analizó tres muestras de *B. thuringiensis* de producción casera, en condiciones de producción inadecuadas, sin la higiene y esterilización necesarias. Se identificaron decenas de especies de microorganismos distintos en muestras de productos que deberían contener solo esporas viables y cristales de *Bacillus thuringiensis*. La identificación de estas bacterias de diferentes especies demuestra que estos productos pueden causar serios problemas de salud, lo que termina afectando no solo a los involucrados en la producción realizada sin los debidos cuidados higiénicos. Algunas muestras de *B. thuringiensis* (Bt) producidas de forma casera en propiedades rurales y con medios alternativos ya han sido probadas y consideradas no aptas para su uso como biopesticida. Se encontraron varios tipos de contaminantes con morfología y color diferente al Bt, entre ellos *B. cereus* y bacterias del género *Microbacterium*, que son patógenos oportunistas asociados a infecciones humanas. La prevalencia de *Enterococcus casseliflavus* y *E. gallinarum* es preocupante, ya que estas especies se han asociado con endocarditis (Dargere et al., 2002) y meningitis en humanos (Iaria et al., 2005; Antonello et al., 2010). La figura 1 muestra placas con colonias aisladas de materiales de fermentación casera, donde se observan colonias irregulares y con diversas coloraciones.

Foto: Uibraci Gomes de Paula Lima;

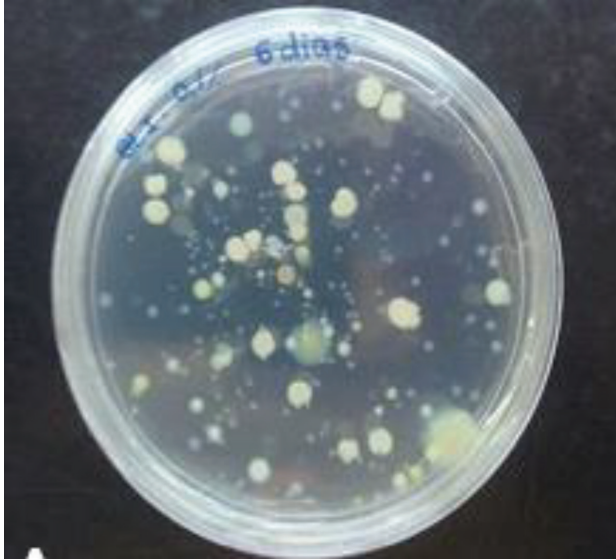


Figura 1. Colonias atípicas aisladas de muestras recibidas de producción casera sin asepsia.

Consideraciones finales

En el proceso de producción industrial de *Trichoderma*, el control de calidad se convierte en un paso fundamental, ya que es posible determinar la concentración y viabilidad de esporas y la determinación de contaminantes, algo que no es posible obtener en un sistema de producción casero.

Además de problemas de calidad, la producción casera puede poner en peligro la salud de los propios agricultores, además de contener microorganismos indeseables para el medio ambiente.

Referencias

- ADEKUNLE, A. T.; CARDWELL, K. F.; FLORINI, D. A.; IKOTUN, T. Seed treatment with *Trichoderma* species for control of damping-off cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. **Biocontrol Science Technolology**, v. 11, n. 4, p. 449-457, 2001.
- ANTONELLO, V. S.; ZENKNER, F. de M.; FRANCA, J.; SANTOS, B. R. *Enterococcus gallinarum meningitis* in an immunocompetent host: a case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 111-112, 2010.
- ANVISA - AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência a Saúde**. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica. Brasília, DF, 2013. 44 p.
- BETTJOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 341 p.
- BETTJOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; NASCIMENTO, R.; AGOSTINI, E. R. dos S.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R.; HADDAD, P. E. **Avaliação da qualidade de produtos à base de *Trichoderma*: curso**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 46 p. apostila.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins. **Manual de Procedimentos para Registro de Agrotóxicos**. Brasília, DF: MAPA, 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecu-rios/insumos-agricolas/agrototoxicos/arquivos/manual-de-procedimentos-para-registro-de-agrototoxicos.pdf>>. Acesso el 18 mar. 2019.
- DARGERÉ, S.; VERGNAUD, M.; VERDON, R.; SALOUC, E.; LE PAGE, O.; LECLERCQ, R.; BAZIN, C. *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2308-2310, 2002.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.
- IARIA, C.; STASSI, G.; COSTA, G. B.; DI LEO, R.; TOSCANA, A.; CASCIO, A. *Enterococcal meningitis* caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, n. 1, p. 3, 2005.
- LAGRANGE-XÉLOT, M.; SCHLEMMER, F.; GALLIEN, S.; LACROIX, B.; MOLINA, J. M. *Trichoderma fungemia* in a neutropenic patient with pulmonary cancer and human immunodeficiency virus infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 12, p. 1190-1192, 2008.
- MEINCKE, R.; WEINERT, N.; RADL, V.; SCHOLTER, M.; SMALLA, K.; BERG, G. Development of a molecular approach to describe the composition of *Trichoderma* communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, n. 1, p. 63-69, 2010.
- MIGUEL, D.; GÓMEZ, P.; GONZÁLEZ, R.; GARCÍA-SUÁREZ, J.; CUADROS, J. A.; BANÁS, M. H.; ROMANYK, J.; BURGALETA, C. Non-fatal pulmonar *Trichoderma viride* infection in an adult patient with acute myeloid leukemia: report of one case and review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, n. 1, p. 33-37, 2005.
- SANDLE, T. *Trichoderma*. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2nd ed. Ámsterdam: Elsevier, 2014. p. 644-646.
- SANTOS-VILLALOBOS, S.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, L. E.; VILLASEÑOR-ORTEGA, F.; PEÑA-CABRIALES, J. J. Production of *Trichoderma asperellum* T8a spores by a "home-made" solid-state fermentation of mango industrial wastes. **Bioresource**, v. 7, n. 4, p. 4938-4951, 2012.
- SINGH, A.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, H. B. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 470-473, 2007.
- SIVILA, N.; ÁLVAREZ, S. **Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar: producción artesanal de *Trichoderma***. San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy, Facultad de Ciencias Agrarias, 2013. 50 p.
- VALICENTE, F. H.; LANA, U. G. de P.; PEREIRA, A. C. P.; MARTINS, J. L. A.; TAVARES, A. N. G. **Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 20 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 239).
- VALICENTE, F. H.; MOURÃO, A. H. C. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-Based biopesticide. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 702-708, 2008.
- WOO, S. L.; RUOCCO, M.; VINALE, F.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; LANZUISE, S.; MAGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, supl. 1, p. 71-126, 2014.